

Aus dem Institut für Anästhesiologie im Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Professor Dr. med. Klaus Peter)

**Wirkung von Ketanest
auf die mitochondriale Atmungskette,
untersucht an Rattenlebermitochondrien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl-Ulrich Soboll
aus Kassel

1981

1982

Aus dem Institut für Anästhesiologie im Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Professor Dr.med. Klaus Peter)

Wirkung von Ketanest auf die mitochondriale Atmungskette,
untersucht an Rattenlebermitochondrien.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

vorgelegt von

Karl-Ulrich Soboll

aus

Kassel



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Roland Scholz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Peter

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9.3.1982

Inhaltsverzeichnis

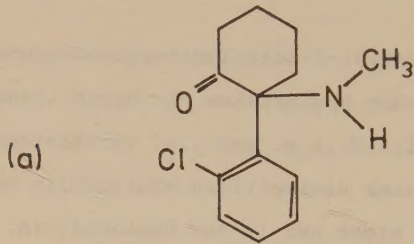
	Seite
1. Einleitung	1
2. Methodik	4
2.1.1 Isolation der Mitochondrien aus Rattenleber	4
2.1.2 Inkubation der Mitochondrien und Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs	5
2.1.3 Isolations- und Inkubationsmedium	7
2.1.4 Messungen	7
2.2 Material	7
3. Ergebnisse	8
3.1 Hemmung der mitochondrialen Atmung durch Ketanest	8
3.2 Angriffsort der Hemmwirkung	12
4. Diskussion	20
4.1 Hemmwirkung von Ketanest	20
4.2 Ort der Hemmwirkung von Ketanest in der Elektronentransportkette	21
4.3 Art der Wechselwirkung von Ketanest mit der Elektronentransportkette	25
4.4 Wirkung von Ketanest in der perfundierten Rattenleber und der Leber in vivo	25
5. Zusammenfassung	31
6. Literatur	32

1. Einleitung.

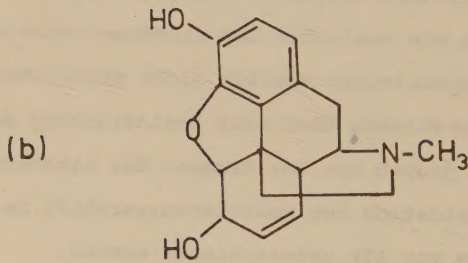
Ketanest (2-(o-Chlorphenyl)-2-Methylaminocyclohexanon) ist ein schnell wirkendes Analgetikum mit hypnotischen Eigenschaften, das oral, i.V., i.m. und i.p. verabreicht werden kann. Wegen seiner vielseitigen Möglichkeit der Verabreichung wird es nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch häufig in der Kleintierpraxis und bei Versuchstieren angewendet (Kreuscher, 1969). Obwohl es chemisch morphinähnlichen Aufbau hat (Abb. 1) und auch in seiner halluzinogenen Wirkung den Morphinderivaten ähnelt (Kreuscher, 1969) unterscheidet es sich von Opioiden durch seine Entkopplung von Analgesie und Atemdepression, d.h. es wirkt im therapeutischen Bereich nicht atmungshemmend. Die atemdepressive Wirkung über eine Beeinflussung des Atemzentrums muß jedoch von der Hemmung der mitochondrialen Atmung bei der Oxidation von Substratwasserstoff bei gleichzeitiger Synthese von ATP unterschieden werden.

1936 zeigte Quastel (Quastel & Wheatley, 1936), daß Barbiturate die Atmung von Gehirnschnitten senken; in der Folgezeit fand man heraus, daß Barbiturate und auch halogenierte Kohlenwasserstoffe die mitochondriale Atmung hemmen (Cohen & Marshall, 1968, Ernster et al., 1963, Hall et al., 1973, Harris et al., 1971, Miller et al., 1973)

und daß diese Wirkung schon bei Konzentrationen eintritt
die unter Narkosebedingungen erreicht werden.



Ketamin (CI -581)



Morphin

Abb. 1 : Strukturformel (a) von Ketamin und (b) von Morphin.

Auch an der isoliert perfundierten Leber wurde bei Infusion von Barbituraten eine Abnahme des Sauerstoffverbrauches beobachtet (Scholz et al., 1966, Biebuyck et al., 1972). Als Angriffsort der Hemmung der mitochondrialen Atmung wurde die Site I der ATP-Bildung in der mitochondrialen Atmungskette identifiziert (Chance & Hollunger, 1963, Ernster et al., 1963).

Die Hemmung der mitochondrialen Atmung sollte eine Verminderung der ATP-Produktion der Zelle zur Folge haben. So wurde in Lebern von Ratten, die mit Nembutal (Reinauer & Hollmann, 1966, Faupel et al., 1972) oder Halothan (Biebuyck et al., 1972) narkotisiert wurden, eine Verminderung des ATP-Gehaltes und des ATP/ADP-Quotienten gefunden. An isoliert perfundierter Rattenleber wurde bei Infusion von Nembutal (Scholz et al., 1966, Biebuyck et al., 1972) oder Effluran (Goetz, 1975) eine Verlangsamung ATP verbrauchender Stoffwechselwege wie Glukoneogenese und Harnstoffsynthese gezeigt. In neuerer Zeit wurde auch für Ketanest eine Hemmung der Glukoneogeneserate von etwa 30% in perfundierter Rattenleber demonstriert (Biebuyck et al., 1972).

Untersuchungen über die Wirkung von Ketanest auf die mitochondriale Atmung liegen noch nicht vor. Die Befunde an perfundierter Rattenleber (Biebuyck et al., 1972) lassen eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels der Zelle vermuten. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die Wirkung von Ketanest auf die mitochondriale Atmungskette isolierter Rattenlebermitochondrien zu untersuchen und zu beschreiben.

2. Methodik.

2.1.1

Isolation der Mitochondrien aus Rattenleber (Klingenberg & Slenczka, 1959).

Eine Ratte mittlerer Größe (etwa 200-250 g) wurde geköpft, die Leber schnell herauspräpariert und in ein Gefäß mit eisgekühltem Isolationsmedium (ca 100 ml) gebracht. Die Leber wurde mit einer Schere zerkleinert und dabei mehrfach gespült bis das Waschmedium fast klar war. Die zerkleinerte Leber wurde in einen 60 ml Glas-Teflon-Potter übergeführt und das Medium auf 60 ml aufgefüllt. Nun wurde das Gemisch im Kühlraum vorsichtig homogenisiert, wobei zu vermeiden ist, daß Luft eingerührt wird, weil sonst die Mitochondrien zerreißen könnten. Das Homogenat wurde auf 4 Zentrifugenbecher (Fa. Sorvall) verteilt und mit Medium bis zur 40 ml Marke aufgefüllt, dann bei 660 x g in einer Kühlzentrifuge bei 0° C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in 4 vorgekühlte Zentrifugenbecher gegossen, und 10 Minuten bei 0° C bei 7700 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Nun wurde der Überstand verworfen, das an der Wand haftende Fett mit Zellstoff ausgerieben und die Mitochondrien (Sediment) um den zentralen Erythrozytenfleck herum abgeschabt. Die Mitochondrien aller 4 Becher wurden in einen Becher übergeführt, auf 40 ml aufgefüllt und nochmal 10 Minuten bei 0° C, 7700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen; die Mitochondrien im Sediment wurden mit 2 ml Medium in einen 5 ml Glas-Teflon-Potter

übergeführt und vorsichtig gepottert. Die Mitochondrien-suspension ist dannach in Eis aufbewahrt etwa 4-5 Stunden haltbar.

2.1.2

Inkubation der Mitochondrien und Bestimmung des Sauerstoff-verbrauchs.

Die Mitochondrien (Endkonzentration ca 1 mg/ml) wurden in einer luftdicht verschließbaren Kammer von 1.4 ml Innenraum (Abb. 2) bei Zimmertemperatur inkubiert.

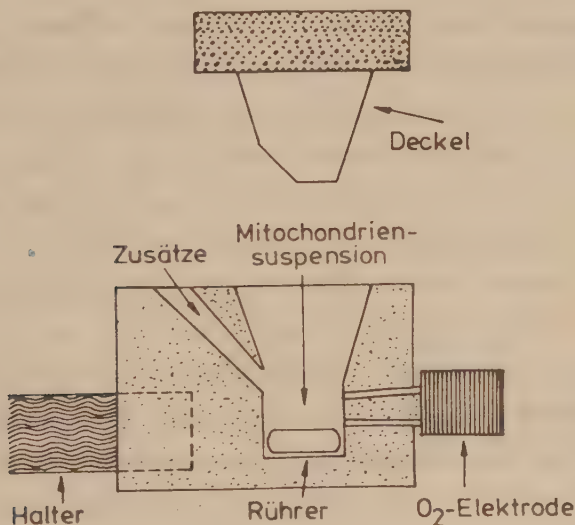
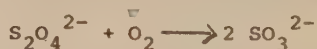


Abb. 2: Inkubationskammer zur Bestimmung des Sauerstoff-verbrauchs isolierter Mitochondrien.

Das Inkubationsmedium war dasselbe, das zur Isolation (siehe 2.1.3) verwendet wurde. Als Substrate wurden Glutamat

und Malat (Endkonzentration 7.2 mM, 5.8 mM), Succinat (7.2 mM) oder Ascorbat + Tetraphenylendiamin (TMPD), (5.9 mM, 0.074 mM), und ADP (1.5 mM) zugesetzt.

Weitere Zugaben werden in der Legende der jeweiligen Experimente angegeben. In die Inkubationskammer ist seitlich eine Sauerstoffelektrode eingeschraubt, die mit einem Sauerstoffmeßgerät und einem Schreiber verbunden ist, so daß der Sauerstoffverbrauch kontinuierlich registriert werden kann. Ferner enthält die Inkubationskammer einen schmalen seitlichen Zugang durch den nach Verschuß der Kammer Zusätze zugegeben werden können. Die Sauerstoffkonzentration wurde amperometrisch mit Hilfe einer Platinelektrode, die mit einer Teflonfolie überzogen war, bestimmt (Clark, 1956). Zur Eichung der Sauerstoffelektrode wurde die Inkubationskammer mit Wasser gefüllt, darauf wurde 10 µl einer gesättigten Natriumdithionitlösung zugegeben und die Kammer verschlossen. Sauerstoff oxidiert Natriumdithionit zu Sulfit:



Die Anzeige des Sauerstoffmeßgerätes und des Schreibers wurde auf 0 gestellt. Nach Entleeren und Reinigen der Meßkammer wurde der Luftsättigungswert bei Zimmertemperatur (~ 2 mM Sauerstoff) mit destilliertem Wasser auf dem Sauerstoffmeßgerät eingestellt. Auf dem Schreiber entsprach das Vollausschlag.

Bei jeder Präparation wurde der Atmungskontrollquotient der Mitochondrien (Atmung mit ADP/Atmung ohne ADP) als Parameter der Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien bestimmt. Er betrug zwischen 3 und 6.

2.1.3

Isolations- und Inkubationsmedium

Als Isolations- und Inkubationsmedium wurde eine Saccharose-lösung folgender Zusammensetzung benutzt:

Saccharose 0.25 M

Triäthanolamin 10 mM

KH_2PO_4 2.5 mM

Das Medium wurde auf pH 7.2 gebracht.

2.1.4

Messungen

Der Proteingehalt in den Inkubationen wurde nach Lowry (Lowry et al., 1951) bestimmt.

2.2

Material

Enzyme und Coenzyme wurden bei der Firma Boehringer (Mannheim) bezogen. Natriumpentobarbital (Nembutal) war von der Firma Abbott (Neuilly-Sur-Seine), Ketamin-hydrochlorid (Ketanest) von Parke-Davis (München). Alle anderen Chemikalien waren von der Fa. Merck (Darmstadt) und waren vom höchsten Reinheitsgrad, der erhältlich war.

3. Ergebnisse

3.1

Hemmung der mitochondrialen Atmung durch Ketanest.

Als Maß der Aktivität der mitochondrialen Atmungskette wird in allen Experimenten die Abnahme der Sauerstoffkonzentration des Mediums pro Minute bei Inkubation mit isolierten Mitochondrien gewertet. Abb. 3 demonstriert die Hemmwirkung des Ketanest bei isolierten Rattenlebermitochondrien.

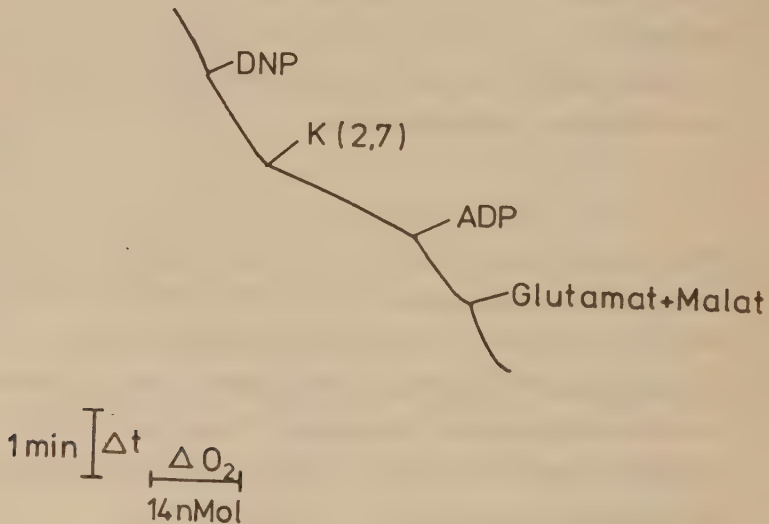
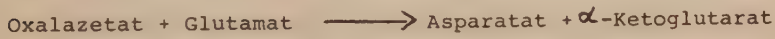
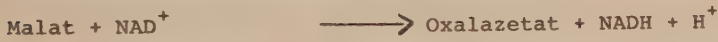


Abb. 3: Hemmwirkung des Ketanest an isolierten Mitochondrien.

Inkubationsbedingungen wie in 2.1.2 beschrieben, Proteinkonzentration 1 mg/ml. K = Ketanest, die Konzentrationsangabe in Klammer ist in mM; DNP = Dinitrophenol in einer Konzentration von 10 μ M.

Substrat der Mitochondrien war Malat, d.h. NADH, das bei der Oxidation des Malat entsteht. Malat wurde stets in Kombination mit Glutamat gegeben, um das bei der Oxidation entstehende Oxalazetat aus der Reaktion zu entfernen.



Durch Zugabe von ADP wird die mitochondriale Atmungskette in den aktiven Zustand versetzt, d.h. es findet oxidative Phosphorylierung mit Malat als Substrat der Oxidationsreaktion und ADP als Substrat der Phosphorylierungsreaktion statt (Abb. 4)

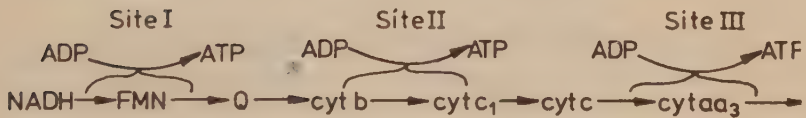


Abb. 4: Schema der mitochondrialen Atmungskette.

FMN = Flavinmononukleotid der NADH-Dehydrogenase,
Q = Ubichinon, cyt = Cytochrome.

Die oxidative Phosphorylierung wurde durch Zugabe von 2,7 mM Ketanest zu ca 50% gehemmt. Die Hemmung erfolgte

unabhängig von der Proteinkonzentration (Tabelle 1)
und war durch Zugabe von Dinitrophenol, einer Substanz,
die die Oxidationsreaktion in der Atmungskette von der
Phosphorylierungsreaktion entkoppelt, nicht aufhebbar (Abb. 3).

Tabelle 1: Hemmwirkung von Ketanest in Abhängigkeit von
der Mitochondrienkonzentration.

Mitochondrien wurden mit Glutamat und Malat als
Substrate wie in 2.1.2 beschrieben, inkubiert.
Die Atmung (nMol O_2 /mg Protein x min) im aktiven
Zustand wurde durch Zugabe von 4 mM Ketanest gehemmt.

Protein- konzentra- tion (mg/ml)	- Ketanest	+ Ketanest	% Hemmung
	Sauerstoffverbrauch		

0.66	19.4	3.5	82
1.33	19.6	4.5	77
2.66	15.7	2.6	83

Aus der Dosiswirkungskurve (Abb. 5) ist ersichtlich, daß
die halbmaximale Hemmung der Atmung bei einer Konzentration
von 2.8 mM Ketanest erfolgte.

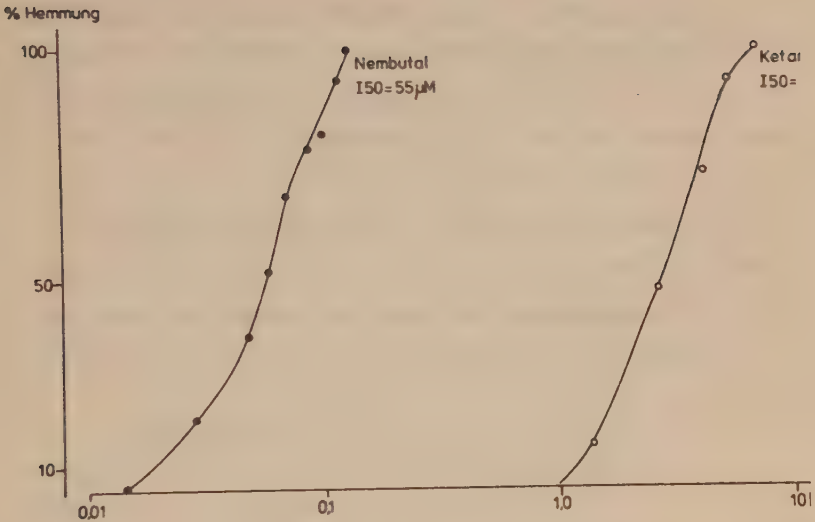


Abb. 5: Dosis-Wirkungskurve für Ketanest und Nembutal.

Inkubation wie in 2.1.2, Glutamat und Malat als Substrat, Proteinkonzentration 1 mg/ml.

Die Dosis-Wirkungskurve wurde durch Inkubation isolierter Rattenlebermitochondrien mit Malat als Substrat erstellt, wobei die Geschwindigkeit der Atmung bei steigenden Mengen Ketanest registriert wurde. Zum Vergleich wurde unter denselben Bedingungen eine Dosis-Wirkungskurve mit Nembutal, einem Barbiturat, das ebenfalls zur Narkose verwendet wird und dessen Hemmwirkung auf die mitochondriale Atmung gut untersucht ist, erstellt (Abb. 5). Die halbmaximale Hemmung trat schon bei einer 50-fach niedrigeren Konzentration ein.

3.2

Angriffsort der Hemmwirkung.

Es ist bekannt, daß Nembutal und andere Narkotika (siehe Einleitung) die Atmungskette an der ersten Stelle der ATP-Synthese (Site I) hemmen (Abb.4). Der Verlauf des Experimentes, das auf Abb. 3 dargestellt ist, läßt vermuten, daß auch Ketanest eine Hemmwirkung an Site I der mitochondrialen Atmungskette ausübt. Die vollständige Hemmung die mit Malat als Substrat bei Zugabe von 5.4 mM Ketanest zu beobachten war, wurde bei Zugabe von Succinat als mitochondriales Substrat teilweise (44%) wieder aufgehoben (Abb. 6).

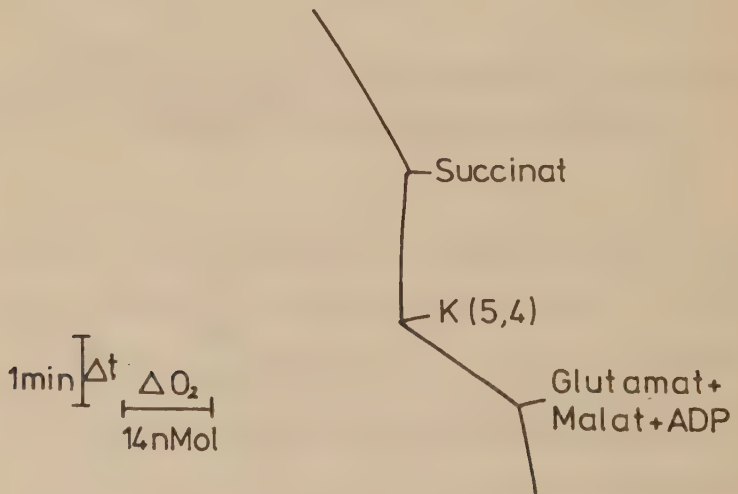


Abb. 6: Aufhebung der Hemmwirkung durch Succinat als Substrat.

Inkubation wie in 2.1.2, Symbole siehe Abb.3.

Succinatdehydrogenase katalysiert die Oxidation von Succinat und Reduktion des Coenzyms FAD zu FADH_2 , welches direkt mit Ubichinon (Abb. 7) also hinter der Site I der mitochondrialen Atmungskette reagiert.

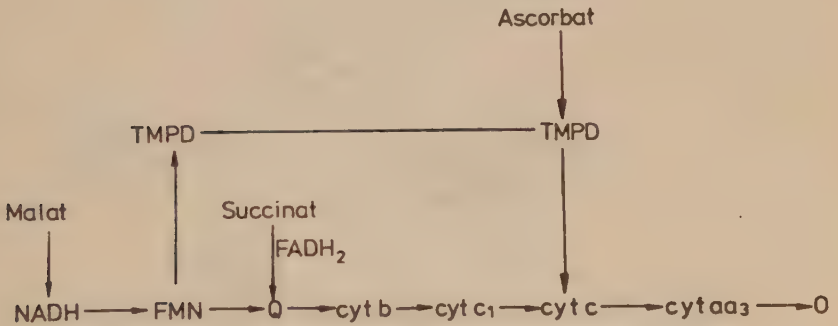


Abb. 7: Elektronendonoren und -akzeptoren der mitochondrialen Atmungskette.

Symbole siehe Abb. 4, TMPD = Tetraphenylendiamin.

Erhöhte man die Konzentration von Ketanest (8 mM) jedoch, so konnte die Atmungskette auch mit Succinat als Substrat vollständig gehemmt werden (Abb. 8).

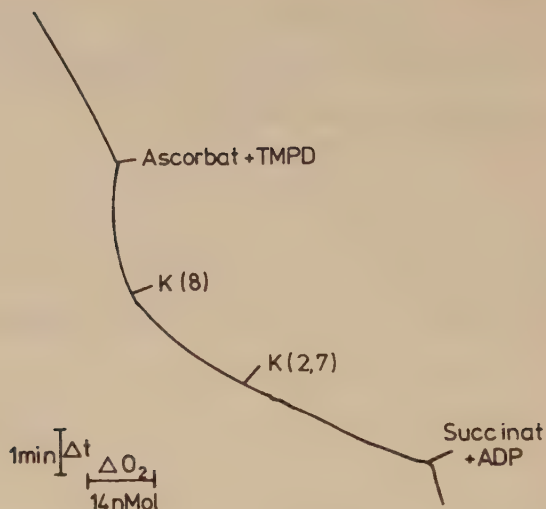


Abb. 8: Hemmung der Succinatatmung durch Ketanest.

Symbole und Inkubationsbedingungen wie in Abb. 3.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, auch die Hemmwirkung bei Succinat als Substrat durch Zusatz von Ascorbat + TMPD aufzuheben. TMPD vermag sowohl mit Ascorbinsäure als auch mit Cytochrom c der Atmungskette (Abb. 7) zu reagieren, die Elektronen gelangen daher hinter Site II in die Atmungskette. Tatsächlich war es möglich, auch nach vollständiger Hemmung der Succinatatmung (8 mM Ketanest) die Aktivität der Atmung durch Gabe von Ascorbat und TMPD zu 30 % wieder zu stimulieren (Abb.8).

Im folgenden Experiment (Abb. 9) wurde versucht, die Aktivität der Atmung mit Ascorbat + TMPD als alleinigen Substraten bei Anwesenheit von hohen Konzentrationen von

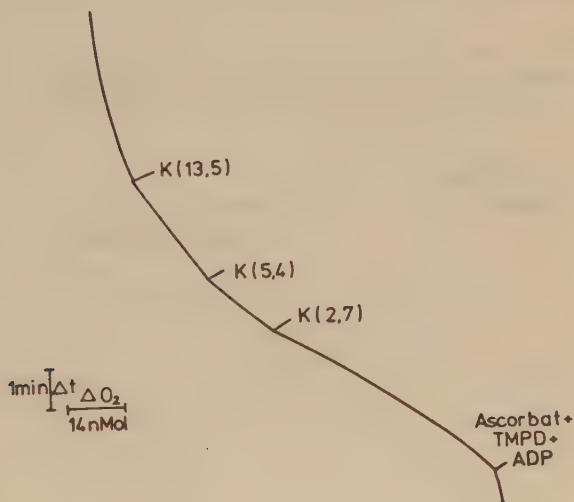


Abb. 9: Hemmung der Atmung durch Ketanest mit Ascorbat + TMPD als Substraten.

Symbole und Inkubationsbedingungen wie in Abb. 3.

Auch bei sehr hohen Dosen (14 mM) konnte keine vollständige Hemmung der Atmung mehr erreicht werden. Höhere Konzentrationen sind nicht sinnvoll, da sonst ein unspezifischer Detergenzeffekt auftritt, der sogar eine vorübergehende Steigerung

des Sauerstoffverbrauches durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zur Folge haben könnte. Die halbmaximale Hemmung der Atmungskette wurde bei Succinat mit 3.6 mM Ketanest und bei Ascorbat + TMPD mit 4.4 mM Ketanest erreicht (Abb. 10).

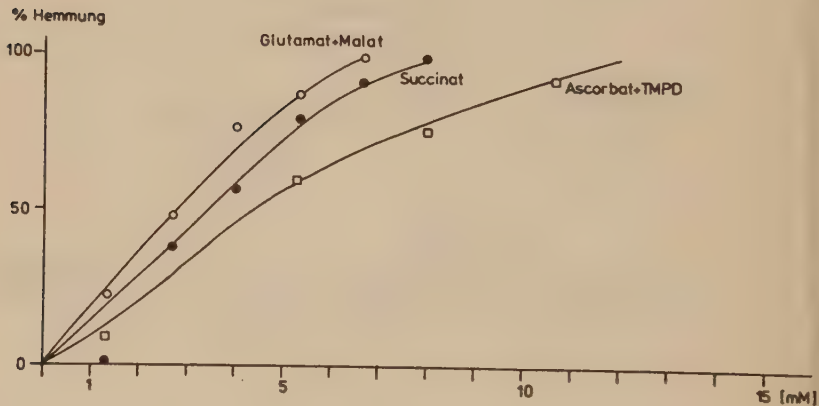


Abb. 10: Dosis-Wirkungskurve für Ketanest bei verschiedenen Substraten der mitochondrialen Atmungskette.

Inkubationsbedingungen siehe 2.1.2, Glutamat + Malat, Succinat, oder Ascorbat + TMPD als Substrate, Proteinkonzentration 1 mg/ml.

Bei niedrigen Konzentrationen von Ketanest (2.7 mM, Tabelle 2) ist der Hemmeffekt auf die Atmungskette mit Malat als Substrat oder Succinat als Substrat sehr ähnlich.

Tabelle 2: Hemmwirkung von Ketanest an Sites I - III
der mitochondrialen Atmungskette.

Mitochondrien wurden mit verschiedenen Substraten wie in 2.1.2 beschrieben, inkubiert. Die Atmung (nMol O₂/mg Protein x min) im aktiven Zustand wurde durch Zugabe von 2.7 mM Ketanest gehemmt.

Substrat	- Ketanest	+ Ketanest	% Hemmung
	Sauerstoffverbrauch		
Glutamat + Malat	14.0	7.3	52
Succinat	20.0	10.3	47
Ascorbat + TMPD	15.5	9.6	38

Es ist deshalb nicht mit Sicherheit zu sagen, ob Site I wirklich gehemmt ist, oder ob bei beiden Substraten nur Site II gehemmt wird. Deshalb wurde durch Zugabe von TMPD alleine, das sowohl mit der NADH-Dehydrogenase als auch mit dem Cytochrom c der mitochondrialen Atmungskette reagieren kann (Abb. 7) Site II überbrückt und die Hemmwirkung von Ketanest mit Malat oder Succinat als Substrat der Atmung untersucht. Dabei wurden die Mitochondrien zunächst mit TMPD und ADP als Substraten inkubiert um alles

TMPD zu oxidieren. Sobald alles TMPD oxidiert war, was man am Verlauf der Sauerstoffkurve erkennen kann (Verlangsamung der Atmung), wurde Malat oder Succinat zugegeben. Es war eine Steigerung der Atmung zu sehen, die Mitochondrien waren jetzt im aktiven Zustand. Die Elektronen laufen bei Malat als Substrat vom Elektronendonator vor Site II (Flavinmononukleotid der NADH-Dehydrogenase) über TMPD zum Cytochrom c bis zum Sauerstoff. Die Hemmkurve für Malat (Abb. 11) zeigt denselben Verlauf wie ohne Überbrückung (Abb. 6).

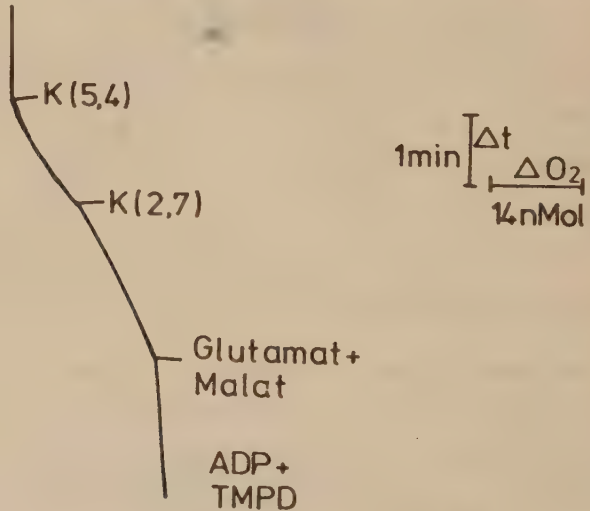


Abb. 11: Hemmwirkung von Ketanest bei Überbrückung von Site II, mit Malat als Substrat.

Inkubationsbedingungen und Symbole wie in den vorigen Experimenten, TMPD wurde in einer Konzentration von 50 μM zugegeben.

Bei Succinat als Substrat ist die Hemmkurve dem Experiment mit TMPD + Ascorbat als Substrat vergleichbar (Abb. 12). Eine vollständige Hemmung konnte auch bei hohen Dosen von Ketanest (14 mM) in diesem Experiment nicht erreicht werden.

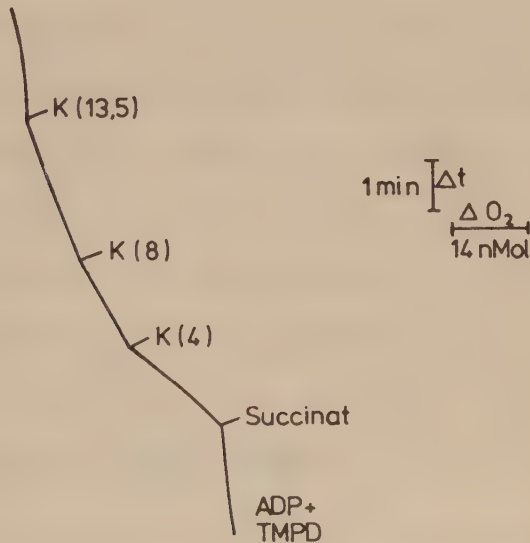


Abb. 12: Hemmwirkung von Ketanest bei Überbrückung von Site II, mit Succinat als Substrat.

Bedingungen siehe Abb. 11.

4. Diskussion

Für eine Reihe von Narkotika verschiedenster Struktur wie Barbiturate (Chance & Hollunger, 1963; Ernster et al., 1963), organische Lösungsmittel (Readfearn & King, 1964) und Halogenkohlenwasserstoffe (Harris et al., 1971) wurde gezeigt, daß sie Site I der mitochondrialen Atmungskette hemmen. Die Hemmung wurde durch eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs isolierter phosphorylierender Mitochondrien (State 3 Atmung), eine Reduktion von NAD^+ und eine Oxidation von Cytochrom b und des Flavins der NADH-Dehydrogenase demonstriert. Am intakten Mitochondrium scheint der Angriffsort für diese Narkotika die NADH-Dehydrogenase zu sein. Im Gegensatz dazu zeigen Untersuchungen an nicht phosphorylierenden mitochondrialen Präparationen (Chance & Hollunger, 1963, Harris et al., 1971), daß die Stelle der Hemmung hinter der NADH-Dehydrogenase, vor dem Ubichinon ist. Daher bezeichnen einige Autoren diese Stelle der Atmungskette als Angriffsort der Hemmung (Harris et al., 1971; Hatefi et al., 1959).

4.1

Hemmwirkung von Ketanest

Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß auch Ketanest die mitochondriale Atmung hemmt. Die Konzentrationen, die zur Hemmung benötigt werden, sind jedoch höher als bei Barbituraten (Abb.5), aber ähnlich wie bei Halogenkohlenwasserstoffen (Harris et al., 1971). Ein stöchiometrischer Effekt

von Ketanest ist daher auszuschließen; folglich hatte die Mitochondrienkonzentration auch keinen Einfluß auf die Hemmwirkung von Ketanest (Tabelle 1). Von Amytal und Rotenon ist bekannt, daß sie auch den Energietransfer an Site I (Chance & Hollunger, 1963) hemmen. So konnte Dinitrophenol die Hemmwirkung von Amytal teilweise wieder aufheben. Die Hemmwirkung von Ketanest konnte durch Dinitrophenol nicht beeinflußt werden (Abb. 3) was gegen eine Hemmung des Energietransfers spricht. Da jedoch nur die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs als Parameter der Hemmwirkung untersucht wurde, und nicht der Reduktionsgrad der Atmungskettenkomponenten oder der P/O-Quotient, kann ein solcher Effekt nicht ausgeschlossen werden. Ein entkoppelnder Effekt auf die Atmungskette kann schon vor der Zunahme des Sauerstoffverbrauchs an einer Änderung des Reduktionsgrades der Atmungskettenkomponenten erkannt werden.

4.2

Ort der Hemmwirkung von Ketanest in der Elektronentransportkette.

Die Hemmwirkung des Ketanest auf den Elektronentransport phosphorylierender Mitochondrien wurde mit Elektronendonoren für Site I (Malat), Site II (Succinat) und Site III (Ascorbat), siehe Abb. 7, beobachtet. Ketanest scheint also im Gegensatz zu anderen Narkotika den Elektronentransfer an allen 3 Sites der Atmungskette zu hemmen. Bei Site III ist jedoch ein Detergenzeffekt nicht auszuschließen, da selbst bei einer Konzentration von 13 mM Ketanest noch keine vollständige

Hemmung erfolgte. Der Hemmeffekt an Site I und II war ähnlich, wenn auch die Konzentrationen von Ketanest, die zur halbmaximalen und zur vollständigen Hemmung der Atmung benötigt wurden, bei Site II deutlich höher liegen, als bei Site I. Dennoch läßt sich eine etwa 50%ige Hemmung der mitochondrialen Atmung durch Ketanest mit Malat als Substrat zu etwa 30% wieder aufheben, wenn man Succinat als Substrat gibt (Abb. 6). Im Gegensatz dazu vermögen Nembutalkonzentrationen, die 10 - 100 mal höher sind, als die Konzentration, die zur vollständigen Hemmung der Malatatmung benötigt werden, die Succinatatmung nicht zu hemmen (Abb. 13).

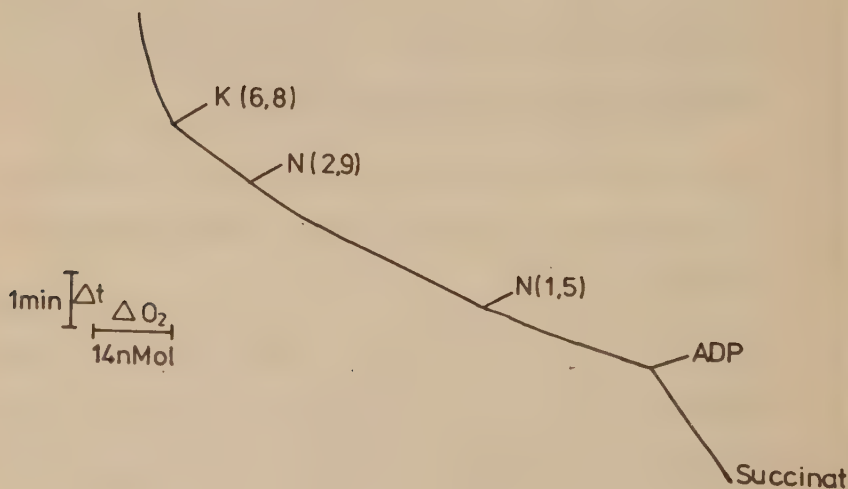


Abb. 13: Hemmwirkung von Site II durch Nembutal.

K = Ketanest, N = Nembutal, Zahlen in Klammern sind Konzentrationsangaben in mM.

Um die Hemmwirkung an Site I und Site II deutlicher unterscheiden zu können, wurde Site II durch TMPD, einen Elektronenüberträger, der sowohl mit der NADH-Dehydrogenase, als auch mit Cytochrom c reagieren kann (Abb. 7), überbrückt und die Hemmwirkung von Ketanest mit Malat oder Succinat als Substraten untersucht. Die Hemmwirkung auf Site II der Elektronentransportkette sollte bei dieser experimentellen Anordnung nicht in Erscheinung treten. Mit Malat als Substrat wird 100%ige Hemmung bei denselben Ketanestkonzentrationen beobachtet, wie ohne TMPD (Abb. 11). Ketanest scheint also wie Barbiturate Site I der Atmungskette zu hemmen. Dasselbe Experiment mit Succinat als Substrat gibt noch detailliertere Hinweise auf die Angriffsorte der Ketanesthemmung. Die Sauerstoffkurve läßt folgende Schlüsse zu :

- 1) Auch an Site II wird der Elektronenfluß durch Ketanest blockiert, da bei Überbrückung von Site II keine vollständige Hemmung mehr erreicht wird.
- 2) Ketanest hemmt die Oxidation von Succinat durch die Succinatdehydrogenase nicht. Bei Überbrückung von Site II durch TMPD dient Succinat offensichtlich als Substrat der Atmungskette. Diese Beobachtung führt zu einer 3. Schlußfolgerung:
- 3) Wenn die Redoxäquivalente von Succinat über die "TMPD-Brücke" in die Atmungskette gelangen, müssen sie einen Schritt rückwärts in der Elektronentransportkette vom Ubichinon zur NADH-Dehydrogenase laufen (Abb. 14) und von dort über TMPD zum Cytochrom c.

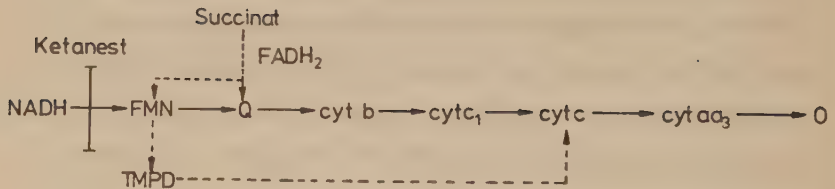


Abb. 14: Elektronenfluß in der Atmungskette mit Succinat bei Hemmung der Atmung durch Ketanest und Überbrückung der Site II durch TMPD.

Dies schließt eine Hemmung an Site I hinter der NADH-Dehydrogenase aus. Es muß vielmehr als Angriffsort der Hemmung der Übergang zwischen NADH und dem Flavinmononukleotid der NADH-Dehydrogenase gefordert werden (Abb: 14).

4.3

Art der Wechselwirkung von Ketanest mit der Elektronentransportkette.

Der Mechanismus der Hemmung der Elektronentransportkette durch Ketanest dürfte ähnlich dem Effekt anderer Narkotika oder organischer Lösungsmittel wie Chloroform oder Methylen-glykol (Ernster et al., 1963) sein. Es wurde als Mechanismus z.B. eine hydrophobe Wechselwirkung des Narkotikums mit Proteinen der Elektronentransportkette vorgeschlagen, die eine geringe konformative Stabilität aufweisen. So könnte ein Hemmstoff dieser Gruppe an einer bestimmten kritischen hydrophoben Region des Elektronen transportierenden Komplexes binden und eine Konformationsänderung hervorrufen, die die katalytischen Eigenschaften des Enzymkomplexes zerstören würde. Diese Interaktion müßte reversibel sein, das heißt, bei Entfernung des Narkotikums würde das Enzym wieder seine katalytisch aktive Konformation einnehmen. Die Reversibilität der Hemmung der Atmung durch Ketanest konnte an perfundierter Leber gezeigt werden (Abb. 15, siehe 4.4).

4.4

Wirkung von Ketanest in der perfundierten Rattenleber und in der Leber in vivo.

Es wurde gezeigt, daß Ketanest die oxidative Phosphorylierung isolierter Rattenlebermitochondrien hemmt. Die Wirkung scheint auf einer Blockierung des Elektronentransportes an Site I und Site II und in hohen Konzentrationen an Site III

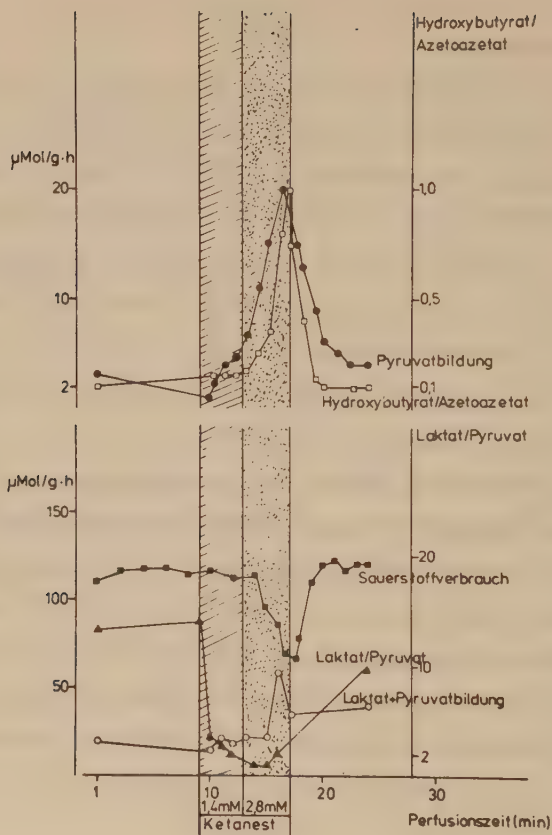


Abb. 15: Wirkung von Ketanest auf Redoxquotienten, Glykolyseaktivität und Sauerstoffverbrauch in perfundierter Rattenleber.

Glykolyseaktivität = Laktat- + Pyruvatbildung;
die Perfusion wurde von Herrn cand. med. dent.
W.D. Schwenke durchgeführt.

zu beruhen. Es erhebt sich die Frage, in welchen Konzentrationen Ketanest am narkotisierten Tier auftritt, ob es überhaupt zu einer Hemmwirkung in vivo kommen kann. In der Ratte ist etwa $\frac{2}{3}$ des Körpergewichtes Wasser, das heißt, bei einer 200 g schweren Ratte wäre der Lösungsraum für 25 mg Ketanest (120 mg/kg , Schwenke et al., 1981) ca 133 ml. Vorausgesetzt, Ketanest würde sich völlig gleichmäßig und ausschließlich im Wasserraum lösen, errechnete sich eine Konzentration von ca 0.7 mM in der Leberzelle. Dieser Wert wird aber sicherlich nicht erreicht, da Ketanest wie andere Narkotika gut lipidlöslich ist und sich in lipidreichen Geweben, wie z.B. dem Gehirn akkumulieren wird. Im Gehirn wäre demnach eine Konzentration von 0.7 mM oder sogar höher vorstellbar, während sie in der Leberzelle vermutlich niedriger ist. Es ist ferner bekannt, daß sich Ketanest nicht in allen Geweben gleichmäßig verteilt; die höchsten Konzentrationen wurden bei Katzen in Leber und Niere, die niedrigsten in Skelett- und Herzmuskel erreicht (Schmid, 1980). Die aktuellen, zur Narkose benötigten Konzentrationen von Ketanest im Körper dürften also weit unter den Werten liegen, die zur halbmaximalen Hemmung der Atmungskette in isolierten Mitochondrien benötigt wurden ($2.8 - 6 \text{ mM}$, Abb. 10). Folglich konnte auch an perfundierter Leber bei einer Ketanestkonzentration von 1.4 mM kein Effekt auf den Sauerstoffverbrauch und den Hydroxybutyrat/Azetoazetat-Quotienten beobachtet werden (Abb. 15). Auch die Glykolyserate ist praktisch nicht erhöht. Eine Reduktion des mitochondrialen

NAD-Systems, angezeigt durch eine Erhöhung des Hydroxybutyrat/Azetoazetat-Quotienten und eine gesteigerte Aktivität der Glykolyse sind empfindliche Parameter für eine Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthese (Soboll et al., 1978). Erst bei einer Konzentration von 2.8 mM Ketanest, die der I_{50} an isolierten Mitochondrien entspricht, kann man eine deutliche Hemmung des Sauerstoffverbrauchs, begleitet von einem Anstieg des Hydroxybutyrat/Azetoazetat-Quotienten und der Aktivität der Glykolyse, beobachten (Abb. 15).

Diese Befunde sprechen gegen einen Hemmeffekt von Ketanest auf die mitochondriale Atmung unter Narkosebedingungen in vivo. Weitere Untersuchungen von Schwenke et al. (1981) sprechen ebenfalls gegen einen solchen Effekt in vivo: Es wurden Ratten entweder mit Nembutal oder mit Ketanest narkotisiert, die Lebern schnell entnommen und friergestoppt und in den Lebern mitochondriale und zytosolische ATP/ADP-Quotienten bestimmt (Schwenke et al., 1981).

Als Kontrolle dienten Lebern nicht narkotisierter Ratten, die mit der Zweiklingenbeilmethode (Faupel et al., 1972) getötet wurden; in diesen Lebern wurden ebenfalls mitochondriale und zytosolische ATP/ADP-Quotienten bestimmt (Tabelle 3). Während mit Nembutal eine deutliche Erniedrigung des mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten beobachtet werden kann, trat dieser Effekt mit Ketanest nicht auf.

Tabelle III: (Aus Schwenke et al., 1981)

Subcellular ratios of ATP and ADP content of liver in unanaesthetized and anaesthetized rats

Subcellular concentrations were calculated from contents by assuming 0.8 ml of water/g of mitochondrial and 3.8 ml/g of cytosolic protein respectively. Abbreviation: n.m., not measured. Data are given as means $\pm$ S.E.M. (n = four different livers).

	Unanaesthetized		Anaesthetized	
	Fed	Starved	Pentobarbital Fed	Ketamine Fed
Total content ($\mu\text{mol/g dry wt.}$)				
ATP	12.4 $\pm$ 0.65	9.97 $\pm$ 0.39	9.88 $\pm$ 0.28	11.3 $\pm$ 0.56
ADP	3.19 $\pm$ 0.16	3.04 $\pm$ 0.12	3.14 $\pm$ 0.11	2.67 $\pm$ 0.25
AMP	0.58 $\pm$ 0.10	0.67 $\pm$ 0.11	n.m.	n.m.
ATP/ADP	3.90 $\pm$ 0.21	3.29 $\pm$ 0.16	3.06 $\pm$ 0.22	4.30 $\pm$ 0.39
Mitochondrial matrix ($\mu\text{mol/ml of mitochondrial water}$)				
ATP	7.49 $\pm$ 0.73	7.92 $\pm$ 0.93	4.21 $\pm$ 0.82	6.42 $\pm$ 0.60
ADP	8.98 $\pm$ 1.84	7.62 $\pm$ 0.84	7.43 $\pm$ 0.73	7.55 $\pm$ 0.97
ATP/ADP	0.92 $\pm$ 0.18	1.04 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.04
Cytosol ($\mu\text{mol/ml of cytosolic water}$)				
ATP	6.18 $\pm$ 0.62	5.33 $\pm$ 0.25	5.62 $\pm$ 0.36	5.91 $\pm$ 0.41
ADP	0.86 $\pm$ 0.23	0.93 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.19
ATP/ADP	6.94 $\pm$ 0.59	5.91 $\pm$ 0.65	5.83 $\pm$ 0.40	10.3 $\pm$ 2.10

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß Ketanest zwar den mitochondrialen Elektronentransport in ähnlicher Weise wie andere Narkotika, z.B. Amytal oder Nembutal hemmt, jedoch in Konzentrationen, die nicht zur Narkose verwendet werden. Der Effekt ist weniger spezifisch als bei Amytal oder Nembutal, er betrifft alle drei Sites der mitochondrialen Elektronentransportkette.

Dies mag an den -absolut gesehen- höheren Konzentrationen liegen, in denen Ketanest erst wirksam wird. Speziell bei den hohen Konzentrationen, bei denen eine Hemmwirkung an Site III auftritt, ist ein Detergenzeffekt nicht auszuschließen. Die Befunde stützen ferner nicht die Hypothese einer Narkosewirkung durch Hemmung der Zellatmung im Gehirn (Warburg, 1930, Harris et al., 1971). Der genaue Mechanismus der Narkosewirkung allgemein, sofern ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt, bleibt weiterhin offen.

5. Zusammenfassung.

Es wurde der Effekt von Ketanest auf die Atmung isolierter Rattenlebermitochondrien untersucht. Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1.) Ketanest hemmt die Atmung isolierter Rattenlebermitochondrien mit Malat, Succinat oder Ascorbat als Substraten für Site I, II oder III der mitochondrialen Elektronentransportkette. Die Dosis, die zur halbmaximalen Hemmung der Atmung benötigt wurde, betrug 2.8, 3.6 und 4.4 mM.
- 2.) Die Hemmwirkung ist unabhängig von der Proteinkonzentration und ist nicht stöchiometrisch in Bezug auf die Komponenten der Elektronentransportkette.
- 3.) Die Hemmwirkung ist durch Dinitrophenol nicht aufhebbar.
- 4.) Die Hemmwirkung erfolgt in einem Konzentrationsbereich, der weit über den Konzentrationen liegt, die zur Narkose verwendet werden.
- 5.) Es kann folglich auch kein Effekt auf die mitochondrialen und zytosolischen ATP/ADP-Quotienten in der Rattenleber in vivo beobachtet werden.

6. Literatur.

1. Biebuyck, J.F., Lund P. und Krebs, H.A. (1972): THE EFFECTS OF HALOTHANE ON GLYCOLYSIS AND BIOSYNTHETIC PROCESSES OR THE ISOLATED PERFUSED RAT LIVER. Biochem.J. 128, 711.
2. Chance, B. und Hollunger, G. (1963): INHIBITION OF ELECTRON AND ENERGY TRANSFER IN MITOCHONDRIA. J. Biol. Chem. 278, 418.
3. Clark, L.C. (1956): MONITORING AND CONTROL OF BLOOD O₂ TENSIONS. Amer. Soc. Art. Int. Organe 2, 41.
4. Cohen, P.J. und Marshall, B.E. (1968) in: TOXICITY OF ANAESTHETICS (Fink, B.R. ed.), Williams and Wilkins Co, Baltimore, 24.
5. Ernster, L., Dallner, G.F. und Azzone, G.F. (1963): DIFFERENTIAL EFFECTS OF ROTENONE AND AMYTAL ON MITOCHONDRIAL ELECTRON AND ENERGY TRANSFER. J. Biol. Chem. 238, 1124.
6. Faupel, R.P., Seitz, H.J. und Tarnowski, W. (1972): THE PROBLEM OF TISSUE SAMPLING FROM EXPERIMENTAL ANIMALS WITH RESPECT TO FREEZING TECHNIQUE, ANOXIA, STRESS AND NARCOSIS. Arch. Biochem. Biophys. 148, 509.
7. Goetz, E. (1975) Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
8. Hall, G.M., Kirtland, S.J. und Baum, H. (1973): THE INHIBITION OF MITOCHONDRIAL RESPIRATION BY INHALATIONAL ANAESTHETIC AGENTS. Brit. J. Anaesth. 45, 1005.
9. Harris, R.A., Munroe, J. Farmer, B., Kim, K.C. und Jenkins, P. (1971): ACTION OF HALOTHANE UPON MITOCHONDRIAL RESPIRATION. Arch. Biochem. Biophys. 142, 435.

10. Hatefi, Y., Lester, R.L., Crane, F.L. und Widmer, C.
(1959): STUDIES ON THE ELECTRON TRANSPORTSYSTEM XVI.
ENZYMIC OXIDOREDUCTION REACTIONS OF COENZYME Q. Biochim.
Biophys. Acta 31, 490.
11. Klingenberg, M. und Slenczka, W. (1959): PYRINNUCLEOTIDE
IN LEBERMITOCHONDRIEN. Biochem. Z. 331, 486.
12. Kreuscher, K.: KETAMINE (1969) Springer Verlag, Berlin-
Heidelberg- New York.
13. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. und Randall, R.J.
(1951): PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT.
J. Biol. Chem. 193, 265.
14. Markham, A., Cameron, J. und White, S.J. (1981): THE EFFECT
OF KETAMINE HYDROCHLORIDE, A NON-BARBITURATE, PARENTERAL
ANAESTHETIC ON OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN RAT LIVER
MITOCHONDRIA. Biochem. Pharmacol. 30, 2165.
15. Miller, R.N., Smith, E.E. und Hunter, F.J. (1973) in:
CELLULAR BIOLOGY AND TOXICITY OF ANAESTHETICS (Fink, B.R. ed.),
Williams and Wilkins Co., Baltimore, 93.
16. Quastel, JH. und Wheatley, A.H.M. (1932): NARCOSIS AND
OXIDATIONS OF THE BRAIN. Proc. Roy. Soc. Lond. 112, 60.
17. Redfearn, E.R. und King, T.S. (1964): MITOCHONDRIAL NADH_2
DEHYDROGENASE AND NADH_2 OXIDASE FROM HEART MUSCLE: POSSIBLE
EXISTENCE OF A FERREDOXIN-LIKE COMPONENT IN THE RESPIRATORY
CHAIN. Nature 202, 1313.
18. Reinauer, H. und Hollmann, S. (1966): DER EINFLUSS DER
NARKOSEART AUF DEN GEHALT AN ADENINNUCLEOTIDEN, LACTAT
UND PYRUVAT IN HERZ, LEBER UND MILZ DER RATTE. Anaesthesist
15, 327.

19. Schmid, A. (1980): WIRKUNGSMECHANISMUS, PHARMAKOLOGISCHE WIRKUNGEN UND NEBENWIRKUNGEN VON KETAMIN-HYDROCHLORID. Tierärztl. Prax. 8, 5.
20. Scholz, R., Schwarz, F. und Bücher, Th. (1966): BARBITURATE UND ENERGIELIEFERNDER STOFFWECHSEL IN DER HÄMOGLOBINFREI DURCHSTRÖMTEN LEBER DER RATTE. Z.Klin. Chem. 4, 179.
21. Schwenke, W.D., Soboll, S., Seitz, H.J. und Sies, H. (1981): MITOCHONDRIAL AND CYTOSOLIC ATP/ADP RATIOS IN RAT LIVER IN VIVO. Biochem. J. 200, 405.
22. Soboll, S., Scholz, R. und Heldt, H.W. (1978): SUBCELLULAR METABOLITE CONCENTRATIONS: DEPENDENCE OF MITOCHONDRIAL AND CYTOSOLIC ATP SYSTEMS ON THE METABOLIC STATE OF PERFUSED RAT LIVER. Eur. J. Biochem. 87, 377.
23. Warburg, O. (1930): THE ENZYME PROBLEM AND BIOLOGICAL OXIDATIONS. Bull. Johns Hopkins Hosp. 46, 341.

Nachtrag.

1981 ist in "Biochemical Pharmacology " (Markham et al, 1981) eine Arbeit erschienen, die die Wirkung von Ketanest auf die mitochondriale Atmungskette zum Thema hat. Der Autor fand in sehr niedrigen Konzentrationen von Ketanest (50µM) eine Entkopplung der Succinatatmung und erst bei höheren Konzentrationen eine Hemmung der Atmungskette. Die Beobachtung einer Entkopplung der Succinatatmung konnte von mir bei identischen Versuchsbedingungen nicht reproduziert werden. Erst mit gealterten Mitochondrien (5 h) konnte eine Entkopplung der Succinatatmung beobachtet werden. Offensichtlich waren die Mitochondrien des Autors in einem schlechten funktionellen Zustand. Es werden auch keine Angaben über den Atmungskontollquotienten gemacht. Ferner wird der Angriffsort der Hemmung nicht untersucht und es werden auch keine Konzentrationen appliziert, die für die Bedingung unter Narkose relevant sind.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. K. Peter dafür, daß er diese Arbeit möglich machte und Herrn Prof. Dr. R. Scholz für seine Anregungen zu dieser Arbeit und seine wohlwollende Unterstützung.

Meiner Frau danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Ausführung der Arbeit.

Auch Fräulein Cornelia Stiller danke ich für die Erstellung des Manuskriptes und die Anfertigung der Bilder.

Herrn W.-D. Schwenke danke ich für die Ausführung der Leberperfusion und die Überlassung von Tabelle III für die Diskussion der Arbeit.

Lebenslauf

Am 26.06.1943 wurde ich, Karl-Ulrich Soboll als Sohn des Kaufmanns Helmut Soboll und seiner Frau Gisela, geb. Greb, in Kassel geboren.

Von 1949-54 besuchte ich die Volksschule in Gelsenkirchen, anschliessend das humanistische Gymnasium in Gelsenkirchen und das Theodor-Heuss-Gymnasium in Heilbronn, an dem ich im Frühjahr 1964 das Abitur ablegte.

Anschliessend leistete ich meinen Wehrdienst an der Sanitätsakademie München bis Frühjahr 1965 ab.

Vom SS 65 an studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Medizin.

Am 07.08.1970 heiratete ich die Apothekerin Sibylle Müller.

Am 22.12.1970 wurde meine Tochter Gisela geboren.

Am 24.07.1972 beendete ich das Staatsexamen für Medizin.

Vom 01.10.72-31.12.73 arbeitete ich im Krankenhaus rechts der Isar, München, städt. Krankenhaus Pappenheim, München und im Knappschaftskrankenhaus Peißenberg als chirurgischer und internistischer Medizinalassistent.

Am 08.01.1974 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Vom 15.01.74-15.01.76 arbeitete ich als chirurgischer Assistent und Notarzt am Krankenhaus Oberföhring, München.

Vom 15.01.75-31.07.79 war ich am Institut für Anaesthesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Direktor Professor Dr. K.Peter, als wissenschaftlicher Assistent beschäftigt.

Meine Anerkennung als Facharzt für Anaesthesie erhielt ich
am 06.12.1978.

Seit 01.02.1980 arbeite ich als leitender Oberarzt für
Anaesthesie am akademischen Lehrkrankenhaus der Universität
Düsseldorf, Lukaskrankenhaus Neuss.

Seit Juli 1979 habe ich mit Unterbrechungen, die durch
meine berufliche Tätigkeit und meine Übersiedlung nach Neuss
verursacht waren, an der vorliegenden Dissertation am
Institut für Anaesthesiologie der Universität München
gearbeitet.

FOTODRUCK J. MAINZ — Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen